

BUNDESREPUBLIK DEUTSCHLAND

10/070663

**PRIORITY
DOCUMENT**SUBMITTED OR TRANSMITTED IN
COMPLIANCE WITH RULE 17.1(a) OR (b)

REC'D 03 OCT 2000

WIPO

PCT

EP 00/08778

4

Bescheinigung

Die Aventis Research & Technologies GmbH & Co KG in Frankfurt am Main/Deutschland
hat eine Patentanmeldung unter der Bezeichnung

"Neue Nukleinsäure aus Tetrahymena kodierend für eine
delta 6-Desaturase, ihre Herstellung und Verwendung"

am 10. September 1999 beim Deutschen Patent- und Markenamt eingereicht.

Die angehefteten Stücke sind eine richtige und genaue Wiedergabe der ursprüng-
lichen Unterlagen dieser Patentanmeldung.

Die Anmeldung hat im Deutschen Patent- und Markenamt vorläufig die Symbole
C 12 N und C 07 H der Internationalen Patentklassifikation erhalten.

München, den 16. Mai 2000

Deutsches Patent- und Markenamt

Der Präsident

Im Auftrag

Aktenzeichen: 199 43 270.8

Jerofsky

Beschreibung

Neue Nukleinsäure aus Tetrahymena kodierend für eine delta 6-Desaturase, ihre Herstellung und Verwendung

Die vorliegende Erfindung betrifft eine delta 6-Desaturase aus Tetrahymena, ihre kodierende Nukleinsäure sowie ihre Herstellung und Verwendung.

Die Erfindung betrifft eine Nukleinsäure aus Tetrahymena die für eine ciliatenspezifische delta 6-Desaturase kodiert, welche in der Biosynthese von kommerziell wertvollen mehrfach ungesättigten Fettsäuren (sog. PUFA engl.: polyunsaturated fatty acids) in Eukaryonten beteiligt ist. Die erfindungsgemäßen Nukleinsäuren und die daraus erhältlichen Polypeptide zeigen eine überraschend geringe Sequenzidentität zu anderen bekannten natürlichen Desaturasen. Die Erfindung betrifft ferner die Verwendung der Nukleinsäuren zur Überexpression in Eukaryonten insbesondere Ciliaten, vorzugsweise Tetrahymena, besonders bevorzugt Tetrahymena thermophila.

Die erfindungsgemäßen Nukleinsäuren sind erhältlich aus Ciliaten, vorzugsweise aus Tetrahymena, besonders bevorzugt aus Tetrahymena thermophila, einem GLA produzierenden Organismus mit sehr hohem GLA-Gehalt.

In Figur 1 ist ein allgemeines Schema der Biosynthese von PUFAs und den beteiligten Enzymen in Eukaryoten (modifiziert nach Gill & Valivety, Trends Biotechnol. 1997, 15:401-409) dargestellt. Die Umwandlung von Stearinsäure (18:0) zu Ölsäure (18:1 $\Delta 9$) wird durch eine delta 9-Desaturase katalysiert. Ölsäure wird durch eine delta 12-Desaturase in Linolsäure (18:2 $\Delta 9,12$; kurz LA) umgewandelt, die wiederum durch eine delta 6-Desaturase in γ -Linolensäure (18:3, $\Delta 6,9,12$; kurz: GLA), bzw. durch eine delta 15-Desaturase in α -Linolensäure (18:3 $\Delta 9,12,15$; kurz: ALA) um-

gewandelt. Die Verlängerung der Fettsäuren wird durch Elongasen katalysiert, wodurch z. B. aus γ -Linolensäure Dihomo- γ -Linolensäure (20:3 $\Delta 8,11,15$; kurz: DGLA) gebildet wird, die wiederum durch eine delta 5-Desaturase zu Arachidonsäure (20:4 $\Delta 5,8,11,15$; kurz: ARA) umgewandelt wird, einem direkten Vorläufer physiologisch wirksamer Eicosanoide, wie z. B. Prostaglandine, Prostacycline, Thromboxane, Leukotriene. Bei der Bildung der PUFAs, die sich von GLA ableiten (nachfolgend delta 6-ungesättigte Fettsäuren genannt), hat sich die Umwandlung von LA zu GLA durch die delta 6-Desaturase als limitierender Schritt gezeigt (Huang YS & Mills DE (1996) γ -linolenic acid. Metabolism and its role in Nutrition and medicine.

AOCS Press, Champaign, Illinois, 1996).

Da Vertebraten keine Doppelbindungen hinter Position 9 in Fettsäuren einfügen können, sind ungesättigte Fettsäuren wie LA und ALA essentielle Nährstoffe, die von Vertebraten nicht synthetisiert werden können (siehe Figur 1), und in der Ernährung hauptsächlich aus pflanzlichen Quellen stammen. LA kann von Säugern durch eine delta 6-Desaturase in GLA umgewandelt werden - eine ARA-Vorstufe - die ein essentieller Vorläufer der meisten Prostaglandine ist. Die Bildung von Stearidonsäure (18:4 $\Delta 6,9,12,15$) - einem Vorläufer der EPA - aus ALA wird ebenfalls mittels delta 6-Desaturase katalysiert. Die delta 6-Desaturase ist damit der erste essentielle Schritt in der Biosynthese der Eicosanoide (siehe Figur 1).

Es hat sich gezeigt, daß die Aktivität der delta 6-Desaturase bei Säugern durch Faktoren wie z. B. Alkoholkonsum, Streß, Mangelernährung und Alterungsprozesse beeinträchtigt werden kann (Huang & Mills, 1996; Horrobin DF (1990) Rev. Con-temp. Pharmacother. 1: 1-45; Bolton-Smith C et al. (1997) Eur. J. Clin. Nutr. 51:619-624; Leventhal LJ et al. (1993) Ann. Intern. Med. 119:867-873). Dies führt zu einer Unterversorgung mit GLA und damit letztlich zu einem Mangel der aus GLA abgeleiteten Moleküle wie ARA und der daraus gebildeten physiologisch wichtigen Eicosanoide, da es sich wie bereits erwähnt bei der Bildung der GLA aus LA durch die delta 6-Desaturase um einen limitierenden Schritt der PUFA-Synthese handelt (Brenner RR (1976) Adv. Exp. Med. Biol. 83:85-101; Nakahara T et al. (1993) J. Jpn. Oil Chem. Soc. 42:242-253; Chapkin, RS (1998) Reappraisal of the essential fatty

acids. In: Fatty acids in food and their health implication (Chow CK, ed) Marcel Dekker, New York, NY). Die Zuführung von GLA kann sowohl einen reduzierten endogenen Spiegel von delta-6 ungesättigten Fettsäuren ausgleichen, als auch einen erhöhten Bedarf an diesen Fettsäuren decken (Horrobin DF (1990)). Für die Biosynthese von aus GLA abgeleiteten Moleküle ist deshalb die Aufnahme von GLA durch die Nahrung vorteilhaft (Fan, YY & Chapkin, RS (1998) J. Nutr. 128:1411-1414).

Der Befund, daß GLA vielfältige positive Einflüsse auf den menschlichen Körper ausübt, wurde inzwischen durch eine Vielzahl wissenschaftlicher Studien untermauert. So wurde die positive Wirkung der GLA z. B. auf atopische Ekzeme (Shimasaki, H: PUFA content and effect of dietary intake of γ -linolenic acid-rich oil on profiles of n-6, n-3 metabolites in plasma of children with atopic eczema. J. Clin. Biochem. Nutr. (1995), 19(3), 183-192.), Rheumatische Arthritis (Zurier, RB; Rossetti, RG; Jacobson, EW; DeMarco, DM; Liu, NY; Temming, JE; White, BM; Laposata, M: γ -linolenic acid treatment of rheumatoid arthritis: A randomized, placebo-controlled trial. Arthritis Rheum. (1996), 39(11), 1808-1817.), Atherosklerose (Leng GC, Lee AJ, Fowkes FGR, Jepson RG, Lowe GDO, Skinner ER, Mowat BF, Randomized controlled trial of γ -linolenic acid and eicosapentaenoic acid in peripheral arterial disease, Clinical Nutrition, (1998) 17/6 265-271.), diabetische Neuropathie (Pfeifer M A; Schumer M P, Clinical trials of diabetic neuropathy: past, present, and future, Diabetis, (1995 Dec) 44 (12) 1355-61.), Migräne (Wagner W, Nootbaar-Wagner U, Prophylactic treatment of migraine with γ -linolenic and alpha-linolenic acids, Cephalalgia, (1997) 17/2, 127-130.), Schizophrenie (Vaddadi, KS: Some observations on the use of prostaglandin E1 precursor in the treatment of schizophrenia. Biol. Aspects Schizophr. Addict. (1982), 183-91. Publisher: Wiley, Chichester, UK) und Krebs (Kairemo KJA, Jekunen AP, Korppi-Tommola ET, Pyrhonen SO: Effects of lithium γ -linolenate on the perfusion of liver and pancreatic tissues in pancreatic cancer. Anticancer Research, (1997) 17/5 B 3729-3736.) durch klinische Studien nachgewiesen. In diesen Studien wurde sowohl eine statistisch als auch eine klinisch signifikante Verbesserung des Krankheitsbildes erzielt. Die Wir-

kung der GLA ruht dabei vor allem auf der Bildung von Eicosanoiden (Prostaglandine, Prostacycline, Thromboxane, Leukotriene), für die GLA ein Vorläufermolekül in der Biosynthese darstellt (Figur 1).

Aufgrund dieser positiven Eigenschaften besteht ein breites Anwendungsspektrum für GLA in der Pharma-, Kosmetik-, Tierfutter- und Lebensmittelindustrie (Horrobin, 1990, Horrobin DF (1992) Prog. Lipid Res. 31:163-194; Chapkin, 1998; Fan & Chapkin, 1998).

Die meisten PUFAs aus Menschen und Tieren stammen entweder direkt aus der Ernährung oder entstehen durch die Umsetzung der durch die Ernährung zugeführten essentiellen Fettsäuren durch Desaturasen und Elongasen. Deshalb sind Gene der PUFA-Biosynthese aus Organismen, in denen diese PUFAs natürlicherweise vorkommen, von großem kommerziellen Interesse. Durch die gezielte, funktionelle Expression dieser Gene in Organismen oder Zellen kann eine kommerzielle Produktion von PUFAs in diesen Systemen erreicht werden. Aus diesem Grund besteht ein Bedarf an Genen für Desaturasen und Elongasen der PUFA-Biosynthese, sowie für die kommerzielle Gewinnung von PUFAs und PUFA-Ölen durch zuverlässige ökonomische Methoden mit Hilfe dieser Gene.

Alle kommerziell genutzten Ölsaaten produzieren keine GLA. GLA kommt vor allem im Öl der Samen verschiedener Pflanzen wie der Nachtkerze (*Oenothera biennis*, ca. 10% GLA), Borretsch (*Borago officinalis*, ca. 23%) und der Schwarzen Johannisbeere (*Ribes nigrum*, ca. 18%) vor. Daneben sind auch verschiedene Mikroorganismen als Quellen für GLA bekannt, wie z. B. die Pilze *Mucor* und *Mortierella* (bis zu ca. 25%), die Blaualge *Spirulina* (ca. 12-18%) und andere. Als besonders GLA reiche Quelle wurden Ciliaten wie z. B. *Tetrahymena* (bis zu 47%; Hill, DL (1972) The biochemistry and physiology of Tetrahymena. Chapter 3, 46-73. Academic press, New York, London; Erwin, J & Bloch, K (1963) J. Biol. Chem. 238:1618-1624) beschrieben. Eine gute Übersicht über natürliche Quellen von GLA geben Phillips & Huang (Phillips JC, Huang YS (1996) Natural sources and biosynthesis of γ -linolenic

acid: an overview. 1-13 In: γ -linolenic acid. Metabolism and nutrition in Nutrition and medicine. Huang YS, Mills DE (eds.) AOCS Press, Champaign, Illinois, 1996).

Die kommerzielle Gewinnung von GLA aus diesen natürlichen Quellen ist jedoch mit einigen Nachteilen verbunden. Sowohl die Qualität als auch die Quantität der aus diesen Organismen gewonnenen Öle schwanken, und teilweise weisen die Öle eine sehr heterogene Zusammensetzung auf, was aufwendige und teure Reinigungsschritte nötig macht um die GLA anzureichern. Der Anbau GLA-haltiger Pflanzen ist darüberhinaus nicht sehr wirtschaftlich (Hansen CE et al. (1991) J. Sci. Food Agric. 54:309-312). Für die Gewinnung von GLA-haltigem Öl hat sich jedoch gezeigt, daß die Raum/Zeit-Ausbeute bei einigen GLA-produzierenden Mikroorganismen im Vergleich zu höheren Pflanzen deutlich besser ist. Aus diesem Grunde bietet die fermentative Herstellung von GLA durch Mikroorganismen eine vielversprechende Alternative zu anderen GLA-Quellen. Es gab bereits Versuche, die fermentative Gewinnung von GLA zu etablieren (Ratledge C (1993) Trends Biochem. 11:278-284; Ratledge C (1989) Biochem. Soc. Trans. 17:1139-1141; Gosselin Y et al. (1989) Biotechnol. Lett. 11:423-426; WO86/03518). Für eine kommerzielle, fermentative GLA-Produktion durch Mikroorganismen ist aber eine Steigerung des GLA-Gehaltes wünschenswert, da die Fermentation PUFA-produzierender Mikroorganismen als relativ aufwendig und teuer und damit als nicht sehr wirtschaftlich erachtet wird (supra Ratledge 1993). Aufgrund seines relativ hohen GLA-Gehalts (supra) ist besonders Tetrahymena thermophila für eine fermentative Gewinnung von GLA geeignet. Tetrahymena kann gut im Fermenter kultiviert werden und es können hohe Zelldichten erreicht werden (Kiy, T. & Tiedke (1992) Appl. Microbiol. Biotechnol. 37, 576-579; Kiy, T. & Tiedke, A. (1992) Appl. Microbiol. Biotechnol. 38, 141-146).

Aufgabe der vorliegenden Erfindung ist es daher, Nukleinsäuren aus Tetrahymena bereitzustellen, welche für ein Polypeptid kodiert mit der Aktivität einer delta 6-Desaturase und deren funktionelle Expression und Überexpression in einem Wirtsgorganismus, vorzugsweise in Tetrahymena, zwecks Anreicherung von GLA und / oder delta 6-ungesättigten Fettsäuren.

Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist daher eine Nukleinsäure gemäß SEQ ID Nr. 1 kodierend für eine delta 6-Desaturase mit einer Aminosäuresequenz gemäß SEQ ID Nr. 2 oder eine funktionelle Variante davon, und Teile davon mit mindestens 8 Nukleotiden, vorzugsweise mit mindestens 15 oder 20 Nukleotiden, insbesondere mit mindestens 100 Nukleotiden, vor allem mit mindestens 300 Nukleotiden (nachfolgend "erfindungsgemäße Nukleinsäure(n)" genannt). Ein weiterer Gegenstand der Erfindung ist ebenfalls eine Nukleinsäure gemäß SEQ ID Nr. 3, enthaltend die genomische Sequenz und die neben der kodierenden Sequenz für eine delta 6-Desaturase auch nicht kodierende Nukleinsäuresequenzen wie Introns, Promotoren und flankierende Sequenzen, beinhaltet.

Die vollständige Nukleinsäure gemäß SEQ ID Nr. 1 kodiert für ein Protein mit 352 Aminosäuren und einer theoretischen molekularen Masse von 41,8 kDa. Die Sequenzanalysen gemäß der vorliegenden Erfindung bestätigen, daß es sich bei der Nukleinsäure um eine Nukleinsäure handelt, die für eine delta 6-Desaturase aus Tetrahymena kodiert.

Durch einen Homologievergleich konnte die aus der Nukleinsäuresequenz (SEQ ID Nr. 1) abgeleitete Proteinsequenz gemäß SEQ ID Nr. 2 als eine delta 6-Desaturase identifiziert werden. Für den Homologievergleich wurde die Funktion BLASP (Altshuler et al. 1997. Nucleic Acids Res. 25:3389-3402) benutzt. Als homologe Proteine wurden Desaturasen, insbesondere delta 6-Desaturasen (E.C. 1.14.99.25; Lindey et al. 1997. Nucleic Acids Res. 25:3389-3402) benutzt. Als homologe Proteine wurde leuyl-CoA desaturase) aus den Datenbanken identifiziert (siehe Figur 2). Die bekannten delta 6-Desaturasen weisen dabei maximal eine Identität von 25% zu der erfindungsgemäßen Polypeptidsequenz auf (siehe Figur 3A-3E). Ein Multiples Alignment verschiedener bekannter delta 6-Desaturasen mit der erfindungsgemäßen Polypeptidsequenz ist in Figur 4 gezeigt. Die Homologien finden sich insbesondere in konservierten Domänen, wie den Histidinboxen (Los & Murata, 1998. Biochem. Biophys. Acta 1394: 3-15; Shanklin, J et al. 1997. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 92, 6743-6747). Darüberhinaus konnte wie bei anderen eukaryotischen delta 6-Desaturasen eine Cytochrom b5 Domäne (Lederer, F. (1994) Biochimie 76, 674-692; Cho et al. J. Biol. Chem. 1999, 274(1): 471-477) identifiziert werden. Obwohl die erfindungsgemäße Polypeptidsequenz sich als delta 6-Desaturase identifizieren

erfindungsgemäße Polypeptidsequenz sich als delta 6-Desaturase identifizieren läßt, unterscheidet sie sich wesentlich von anderen delta 6-Desaturasen. Auffällig ist vor allem, daß die Sequenz mit 352 Aminosäuren rund 20% kürzer als andere eukaryotischen delta 6-Desaturasen ist. Drüber hinaus weist die Sequenz in stark konservierten Bereichen eine Vielzahl von einzigartigen Abweichungen auf. So ist z.B. das bei anderen delta 6-Desaturasen zu 100% konservierte HHLFP-Motiv abgewandelt in HHFFP (siehe Figur 4). Die Identität der erfindungsgemäßen Polypeptidsequenz zu bekannten Desaturasen ist aus diesen Gründen überraschend gering.

In einer bevorzugten Ausführungsform ist die erfindungsgemäße Nukleinsäure eine DNA oder RNA, vorzugsweise eine doppelsträngige DNA, und insbesondere eine DNA mit einer Nukleinsäuresequenz bzw. eine funktionelle Variante der Nukleinsäuresequenz gemäß SEQ ID No 1 von Pos. 33 bis Pos. 1091. Die beiden Positionen bestimmen gemäß der vorliegenden Erfindung den Start und das Ende des kodierenden Bereiches.

Unter dem Begriff "funktionelle Variante" versteht man gemäß der vorliegenden Erfindung eine Nukleinsäure, die funktionell mit der delta 6-Desaturase aus Tetrahymena verwandt ist. Solche Nukleinsäuren sind beispielsweise Nukleinsäuren aus anderen Ciliaten-Zellen oder allelische oder degenerierte Varianten. Die Erfindung umfaßt ebenfalls funktionelle Varianten der erfindungsgemäßen Nukleinsäuren, die aufgrund des ungewöhnlichen Codongebrauchs (siehe: Wuitschick JD, Karrer KM (1999) Analysis of genomic G + C content, codon usage, initiator codon context and translation termination sites in Tetrahymena thermophila. J. Eukaryot. Microbiol. 1999 46(3):239-47) eine Anpassung der erfindungsgemäßen Nukleinsäuren in ausgewählten Expressionssystemen erfordern. Zum einen betrifft dies den Austausch der Codons TAA und TAG, welche in Ciliaten Glutamin kodieren und in den meisten anderen Expressionssystemen Stop-Codons sind, in CAA und CAG. Darüber hinaus ist es dem Fachmann bekannt die erfindungsgemäßen Nukleinsäuren an die jeweilige besondere Codonpräferenz (sog. "Codon-usage") verschiedener Expressionssysteme optimal anzupassen. Die Modifizierung der Nukleinsäuren kann in bekannter Weise durch einen gezielten Austausch von Basen erfolgen oder die erforderliche

erfindungsgemäße Polypeptidsequenz sich als delta 6-Desaturase identifizieren läßt, unterscheidet sie sich wesentlich von anderen delta 6-Desaturasen. Auffällig ist vor allem, daß die Sequenz mit 352 Aminosäuren rund 20% kürzer als andere eukaryotischen delta 6-Desaturasen ist. Drüber hinaus weist die Sequenz in stark konservierten Bereichen eine Vielzahl von einzigartigen Abweichungen auf. So ist z.B. das bei anderen delta 6-Desaturasen zu 100% konservierte HHLFP-Motiv abgewandelt in HHFFP (siehe Figur 4). Die Identität der erfindungsgemäßen Polypeptidsequenz zu bekannten Desaturasen ist aus diesen Gründen überraschend gering.

Nukleinsäure aus künstlich hergestellten Oligonukleotiden gewonnen. Die Anpassung der Sequenz kann z. B. auf der Basis der bekannten Codongebrauchstabellen (z. B. im Internet: <http://www.dna.affrc.go.jp/~nakamura/CUTG.html>) der bevorzugten Expressionssysteme durchgeführt werden. Auch umfaßt die vorliegende Erfindung Varianten von Nukleinsäuren, die nur Teile der Nukleinsäure enthalten.

Im weiteren Sinne versteht man unter dem Begriff "Varianten" gemäß der vorliegenden Erfindung Nukleinsäuren, die eine Homologie, insbesondere eine Sequenzidentität von ca. 60%, vorzugsweise von ca. 75%, insbesondere von ca. 90% und vor allem von ca. 95% aufweisen.

Die Teile oder Fragmente der erfindungsgemäßen Nukleinsäuren können beispielsweise zur Herstellung einzelner Epitope, als Sonden zur Identifizierung weiterer funktioneller Varianten oder als Antisense-Nukleinsäuren verwendet werden. Beispielsweise eignet sich eine Nukleinsäure aus mindestens ca. 8 Nukleotiden als Antisense-Nukleinsäure, eine Nukleinsäure aus mindestens ca. 15 Nukleotiden als Primer beim PCR-Verfahren, eine Nukleinsäure aus mindestens ca. 20 Nukleotiden für die Identifizierung weiterer Varianten und eine Nukleinsäure aus mindestens ca. 100 Nukleotiden als Sonde.

In einer weiteren bevorzugten Ausführungsform enthält die erfindungsgemäße Nukleinsäure eine oder mehrere nicht-kodierende Sequenzen (UTR u.a.). Die nicht-kodierenden Sequenzen sind beispielsweise Intronsequenzen oder regulatorische Sequenzen, wie Promotor- oder Enhancer-Sequenzen, zur kontrollierten Expression des delta 6-Desaturase kodierenden Gens. Daher ist ein Gegenstand der Erfindung eine erfindungsgemäße Nukleinsäure gemäß SEQ ID Nr. 3, welche aus Tetrahymena thermophila isoliert werden kann.

In einer weiteren Ausführungsform ist die erfindungsgemäße Nukleinsäure daher in einem Vektor, vorzugsweise in einem Expressionsvektor enthalten.

Die Expressionsvektoren können beispielsweise prokaryotisch oder eukaryotische Expressionsvektoren sein. Beispiele für prokaryotische Expressionsvektoren sind für die Expression in *E. coli* z.B. der T7 Expressionsvektor pGM10 (Martin, 1996), welcher für einen N-terminalen Met-Ala-His6-Tag kodiert, der eine vorteilhafte Reinigung des exprimierten Proteins über eine Ni²⁺-NTA-Säule ermöglicht. Als eukaryotische Expressionsvektoren für die Expression in *Saccharomyces cerevisiae* eignen sich z.B. die Vektoren p426Met25 oder p426GAL1 (Mumberg et al. (1994) Nucl. Acids Res., 22, 5767), für die Expression in Insektenzellen z.B. Baculovirus-Vektoren wie in EP-B1-0127839 oder EP-B1-0549721 offenbart, und für die Expression in Säugerzellen z.B. SV40-Vektoren, welche allgemein erhältlich sind.

Im allgemeinen enthalten die Expressionsvektoren auch für die Wirtszelle geeignete regulatorische Sequenzen, wie z.B. den trp-Promotor für die Expression in *E. coli* (s. z.B. EP-B1-0154133), den ADH-2-Promotor für die Expression in Hefen (Russel et al. (1983), J. Biol. Chem. 258, 2674), den Baculovirus-Polyhedrin-Promotor für die Expression in Insektenzellen (s. z.B. EP-B1-0127839) oder den frühen SV40-Promotor oder LTR-Promotoren z.B. von MMTV (Mouse Mammary Tumour Virus; Lee et al. (1981) Nature, 214, 228).

Die erfindungsgemäßen Nukleinsäuren können beispielsweise chemisch anhand der in SEQ ID Nr. 1 und 3 offenbarten Sequenzen oder anhand der in SEQ ID Nr. 2 offenbarten Peptidsequenz unter Heranziehen des genetischen Codes z.B. nach der Phosphotriester-Methode synthetisiert werden (s. z.B. Uhlman, E. & Peyman, A. (1990) Chemical Reviews, 90, 543, No. 4). Eine weitere Möglichkeit, die erfindungsgemäßen Nukleinsäuren in die Hand zu bekommen, ist die Isolierung aus einer geeigneten Genbank, von einem Organismus, der delta 6-Desaturase Aktivität besitzt, anhand einer geeigneten Sonde (s. z.B. Sambrook, J. et al. (1989) Molecular Cloning. A laboratory manual. 2nd Edition, Cold Spring Harbor, New York). Als Sonde eignen sich beispielsweise einzelsträngige DNA-Fragmente mit einer Länge von ca. 100 bis 1000 Nucleotiden, vorzugsweise mit einer Länge von ca. 200 bis 500 Nucleotiden, insbesondere mit einer Länge von ca. 300 bis 400 Nucleotiden, deren

Sequenz mit einer Nukleinsäuresequenz gemäß SEQ ID Nr. 1 oder 3 abgeleitet werden kann.

Daher betrifft die Erfindung ebenfalls ein Verfahren zur Herstellung einer erfindungsgemäßen Nukleinsäure, wobei die Nukleinsäure chemisch synthetisiert oder anhand einer Sonde aus einer Genbank isoliert wird.

Ein weiterer Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist auch das Polypeptid selbst mit einer Aminosäuresequenz gemäß SEQ ID Nr. 2 oder einer funktionellen Variante davon, und Teile davon mit mindestens sechs Aminosäuren, vorzugsweise mit mindestens 12 Aminosäuren, insbesondere mit mindestens 65 Aminosäuren und vor allem mit mindestens 150 Aminosäuren (nachfolgend "erfindungsgemäßes Polypeptid" genannt). Beispielsweise kann ein ca. 6-12, vorzugsweise ca. 8 Aminosäuren langes Polypeptid ein Epitop enthalten, das nach Kopplung an einen Träger zur Herstellung von spezifischen poly- oder monoklonalen Antikörpern dient (siehe hierzu z. B. US 5,656,435). Polypeptide mit einer Länge von mindestens ca. 65 Aminosäuren können auch direkt ohne Träger zur Herstellung von poly- oder monoklonalen Antikörpern dienen.

Unter dem Begriff "funktionelle Variante" im Sinne der vorliegenden Erfindung versteht man Polypeptide, die funktionell mit dem erfindungsgemäßen Peptid verwandt sind, d.h. eine delta 6-Desaturase Aktivität aufweisen.

Im weiteren Sinne versteht man darunter auch Polypeptide, die eine Sequenzhomologie, insbesondere eine Sequenzidentität von ca. 70%, vorzugsweise von ca. 80%, insbesondere von ca. 90%, vor allem von ca. 95% zu dem Polypeptid mit der Aminosäuresequenz gemäß SEQ ID Nr. 2 haben.

Des weiteren sind Polypeptide bevorzugt die konservierte Bereiche von Histidinbo-
xen und eine Cytochrome b5 Domäne aufweisen. Besonders bevorzugt sind erfindungsgemäße Polypeptide die ein HHFFP – Motiv enthalten.

Ferner zählen hierzu auch Deletion des Polypeptids im Bereich von ca. 1 - 60, vorzugsweise von ca. 1 - 30, insbesondere von ca. 1 - 15, vor allem von ca. 1 - 5 Aminosäuren. Beispielsweise kann die erste Aminosäure Methionin fehlen, ohne daß die Funktion des Polypeptids wesentlich verändert wird. Daneben zählen hierzu auch Fusionsproteine, die die oben beschriebenen erfindungsgemäßen Polypeptide enthalten, wobei die Fusionsproteine selbst bereits die Funktion einer delta 6-Desaturase haben oder erst nach Abspaltung des Fusionsanteils die spezifische Funktion bekommen können. Vor allem zählen hierzu Fusionsproteine mit einem Anteil von insbesondere nicht-ciliaten Sequenzen von ca. 1 - 200, vorzugsweise ca. 1 - 150, insbesondere ca. 1 - 100, vor allem ca. 1 - 50 Aminosäuren. Beispiele von nicht-Ciliaten Peptidsequenzen sind prokaryotische Peptidsequenzen, z.B. aus der Galactosidase von *E. coli* oder ein sogenannter Histidin-Tag, z.B. ein Met-Ala-His6-Tag. Ein Fusionsprotein mit einem sogenannten Histidin-Tag eignet sich besonders vorteilhaft zur Reinigung des exprimierten Proteins über Metallionen-haltige Säulen, beispielsweise über eine Ni²⁺-NTA-Säule. "NTA" steht für den Chelator "nitrilotriacetic acid" (Qiagen GmbH, Hilden).

Die Teile des erfindungsgemäßen Polypeptids repräsentieren beispielsweise Epitope, die spezifisch von Antikörpern erkannt werden können.

Das erfindungsgemäße Polypeptid kann beispielsweise durch Expression der erfindungsgemäßen Nukleinsäure in einem geeigneten Expressionssystem, wie oben bereits beschrieben, nach dem Fachmann allgemein bekannten Methoden hergestellt werden. Als Wirtszellen eignen sich beispielsweise die *E. coli* Stämme DH5, HB101 oder BL21, der Hefestamm *Saccharomyces cerevisiae*, die Insektenzelllinie Lepidopteran, z.B. von *Spodoptera frugiperda*, oder tierische Zellen wie COS, Vero, 293 und HeLa, die alle allgemein erhältlich sind.

Insbesondere die genannten Teile des Polypeptids können auch mit Hilfe der klassischen Peptidsynthese (Merrifield-Technik) synthetisiert werden. Sie eignen sich insbesondere zur Gewinnung von Antisera, mit deren Hilfe geeignete Genexpressi-

onsbank gesucht werden können, um so zu weiteren funktionellen Varianten des erfindungsgemäßen Polypeptids zu gelangen.

Ein weiterer Gegenstand der vorliegenden Erfindung bezieht sich daher auf ein Verfahren zur Herstellung eines erfindungsgemäßen Polypeptids, wobei eine erfindungsgemäße Nukleinsäure in einer geeigneten Wirtszelle exprimiert und gegebenenfalls isoliert wird.

Ein anderer Gegenstand der vorliegenden Erfindung bezieht sich auch auf Antikörper, die mit dem erfindungsgemäßen Polypeptid spezifisch reagieren, wobei die oben genannten Teile des Polypeptids entweder selbst immunogen sind oder durch Koppelung an geeignete Träger, wie z.B. bovines Serumalbumin, immunogen gemacht bzw. in ihrer Immunogenität gesteigert werden können.

Die Antikörper sind entweder polyklonal oder monoklonal. Die Herstellung, die ebenfalls einen Gegenstand der vorliegenden Erfindung darstellt, erfolgt beispielsweise nach allgemein bekannten Methoden durch Immunisieren eines Säugetiers, beispielsweise eines Kaninchens, mit dem erfindungsgemäßen Polypeptid oder den genannten Teilen davon, gegebenenfalls in Anwesenheit von z.B. Freund's Adjuvant und/oder Aluminiumhydroxidgelen (s. z.B. Diamond, B.A. et al. (1981) *The New England Journal of Medicine*, 1344). Die im Tier aufgrund einer immunologischen Reaktion entstandenen polyklonalen Antikörper lassen sich anschließend nach allgemein bekannten Methoden leicht aus dem Blut isolieren und z.B. über Säulenchromatographie reinigen. Bevorzugt wird eine Affinitätsreinigung der Antikörper, der beispielsweise das C-terminale Desaturase-Fragment an eine NHS-aktivierte HiTrap-Säule gekoppelt wurde.

Monoklonale Antikörper können beispielsweise nach der bekannten Methode von Winter & Milstein (*Winter, G. & Milstein, C. (1991) Nature*, 349, 293) hergestellt werden.

Obwohl bereits delta 6-Desaturasen aus anderen Organismen beschrieben wurden, bietet sich Tetrahymena, aufgrund der besonders hohen Raum/Zeit-Ausbeute bei der Produktion von GLA sowohl als Ausgangspunkt für die Erzeugung hochproduktiver, kommerziell bedeutender Stämme durch gentechnische Methoden, als auch als Quelle für die Gene der PUFA-Biosynthese an. In der vorliegenden Erfindung wird dementsprechend die delta-6-Desaturase und ihre Verwendung aus dem GLA-produzierenden Ciliaten Tetrahymena thermophila beschrieben.

Die gezielte Modifizierung der Zusammensetzung des Fettsäurespektrums durch gentechnische Methoden wird in Napier J et al. (Curr. Opin. Plant Biol. (1999) 123-127), Murphy & Piffanelli (Soc. Exp. Biol. Semin. Ser. 67 (Plant Lipid Biosynthesis), (1998) 95-130) und Facciotti & Knauf (In: Adv. Photosynth. 6: Lipids in Photosynthesis: Structure, Function and Genetics. Siegenthaler & Murata (eds.) Kluwer Academic Publishers. Netherlands. (1998) 225-248) beschrieben.

In den Schriften WO98/46763, WO98/46764 und WO98/46765 werden Desaturasen aus dem Pilz Mortierella und die Verwendung der Gene zur Produktion von PUFAs, sowie einige teilweise partielle Sequenzen von Desaturasen beschrieben. In WO93/06712 und WO96/21022 werden $\Delta 6$ -Desaturasen aus einem Cyanobakterium und aus Borretsch sowie die Verwendung dieser Sequenzen zur Produktion von PUFAs in Cyanobakterien und Pflanzen beschrieben. In WO99/27111 wird eine Desaturase aus Nematoden und die Verwendung zur Produktion von PUFAs beschrieben. Aus der Literatur sind ebenfalls delta 6-Desaturasen bekannt. Es handelt sich dabei jedoch vor allem um delta-6-Desaturasen aus Pflanzen (Borretsch (Sayanova et al. (1997) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 1997, 94: 4211-4216), Physcomitrella (Girke et al. (1998) Plant-J. 1998 15(1): 39-48), Sonnenblume (Sperling et al. (1995) Eur. J. Biochem. 1995, 232: 798-805)), Pilzen (Mortierella), Tieren (Maus, Ratte, Caenorhabditis (Napier et al. (1998) Biochem. J. 330(2), 611-614)), Cyanobakterium (Reddy et al. (1993) Plant Mol. Biol. 1993, 293-300).

Ziel ist es, die funktionelle, heterologe Expression dieser Gene in Kulturpflanzen, insbesondere Ölsaaten wie z.B. Raps, Sonnenblume und anderen. Die GLA-Ausbeuten sind in allen bisher veröffentlichten Fällen jedoch entweder sehr gering oder die durch "genetic engineering" erzeugten GLA-produzierenden Organismen mit delta 6-Desaturase-Aktivität sind ohne kommerzielle Bedeutung.

Aufgrund des beschriebenen hohen GLA-Gehalts von Tetrahymena ist es vorteilhaft die Gene der PUFA-Biosynthese aus diesem Organismus für die Entwicklung hochproduktiver, kommerziell bedeutender Stämme durch gentechnische Methoden zu benutzen. Durch die Möglichkeit, Tetrahymena gut in Massenkultur mit einer hohen Zelldichte zu kultivieren, ist es darüber hinaus vorteilhaft Tetrahymena selbst zur Erzeugung solcher hochproduktiver, kommerziell interessanter Stämme durch gentechnische Methoden zu benutzen. Des Weiteren können neben Tetrahymena auch andere Organismen mit Hilfe der erfindungsgemäßen Nukleinsäure zur Produktion von GLA oder anderen delta 6 ungesättigten Fettsäuren benutzt werden.

Mit Hilfe der erfindungsgemäßen Nukleinsäuren, kodierend für eine ciliatenspezifische delta 6-Desaturase aus Tetrahymena, können transgene Organismen erzeugt werden, welche GLA und delta 6-ungesättigte Fettsäuren produzieren, bzw. deren Gehalt gegenüber Wildtypzellen (hier: Tetrahymena thermophila) deutlich erhöht ist. Dabei handelt es sich bevorzugt um Ciliaten, besonders bevorzugt Tetrahymena, welche die erfindungsgemäße Nukleinsäuresequenz enthalten, bzw. in funktioneller Weise exprimieren. Die Expression der Desaturase in dieser Weise führt zu einem relativen Anstieg von delta-6-ungesättigten Fettsäuren, bzw. davon abgeleiteten Folgeprodukten, basierend auf einer veränderten Konzentration von Enzymen und Substraten der PUFA-Synthese. Die Erfindung findet Anwendung in der kommerziellen Produktion von PUFAs, insbesondere von GLA und davon abgeleiteten PUFAs oder anderen Folgeprodukten, die sich von GLA ableiten lassen, bzw. $\Delta 6$ -ungesättigten Fettsäuren (s. Figur 1: PUFA-Biosynthese). Neben GLA kann so z.B. durch die Desaturierung der ALA auch Stearidonsäure (18:4 $\Delta 6,9,12,15$) hergestellt werden, ein industriell vielfach genutzter Rohstoff.

In einer besonderen Ausführungsform kann durch die Veränderung der delta 6-Desaturase kodierenden erfindungsgemäßen Nukleinsäuren in funktioneller Kombination mit geeigneten regulativen Sequenzen eine verstärkte Expression des Enzyms der GLA-Gehalt in GLA-produzierenden Organismen erhöht werden, bzw. GLA in LA-produzierenden Organismen produziert werden. Von besonderem Interesse sind dabei z.B. ölproduzierende Organismen wie Sonnenblume, Raps, Soja aber auch andere. Darüber hinaus können durch die gleichzeitige Verwendung z. B. einer delta 12-Desaturase (z. B. Sakuradani E et al. (1999) Eur. J. Biochem. 261:812-820, Okuley et al. Plant-Cell. 1994 Jan; 6(1): 147-58.) die besagten PUFAs in Organismen oder Zellen produziert werden, die keine oder nur wenig LA enthalten. Ebenfalls eine Kombination der drei an der GLA-Bildung beteiligten Desaturasen $\Delta 6$, $\Delta 9$ und $\Delta 12$ zur Produktion von GLA und delta 6-ungesättigte Fettsäuren ist möglich. Des weiteren ist die Kombination mit weiteren Genen der PUFA-Biosynthese (vgl. Figur 1) eine weitere bevorzugte Ausführung der Erfindung, wobei die GLA und delta 6-ungesättigte Fettsäuren mittels weiterer Enzyme umgesetzt werden, für die GLA als Substrat dient, wodurch z.B. ARA (20:4) und andere Moleküle, die sich von GLA ableiten, hergestellt werden können.

Außerdem kann die Erfindung zur Herstellung neuer GLA-haltiger Nahrungsquellen, bzw. von Nahrungsquellen die reich an Molekülen (insbesondere PUFAs, z. B. ARA) sind, die sich von GLA oder anderen $\Delta 6$ -ungesättigten Fettsäuren ableiten lassen, benutzt werden.

Die vorliegende Erfindung beschreibt weiterhin Expressionskonstrukte die das delta 6-Desaturase Gen oder Teile davon enthalten, sowie die funktionelle Kombination der delta 6-Desaturase kodierenden Sequenz mit heterologen regulativen Sequenzen.

Ein weiterer Gegenstand der Erfindung ist die Herstellung transgener Organismen mit erhöhtem GLA-Gehalt, durch die Verwendung der beschriebenen delta 6-Desaturase kodierenden DNA-Sequenz und der beschriebenen funktionellen Konstrukte des delta 6-Desaturase Gens.

Für die Isolierung von genomischer DNA und von mRNA, sowie die Herstellung von genomischer und cDNA-Banken sind eine Vielzahl gut etablierter Methoden bekannt (z.B. in Sambrook et al. (1989) in Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor, NY). Die Herstellung geeigneter Vektoren, welche die in der Erfindung beschriebene Desaturase, bzw. Teile daraus enthalten, können mit dem Fachmann bekannten Methoden, wie sie z. B. in Ausubel et al. (Ausubel et al. (1995), Current Protocols in Molecular Biology, Green Publishing Associates, New York) und Sambrook et al. 1989 beschrieben sind, hergestellt werden.

Vektoren, welche die delta 6-Desaturase kodierende Sequenz enthalten, können durch Infektion, Transfektion, Elektroporation, Partikelbeschuss und anderen Methoden in Zellen eingeschleust werden. Mit Transformation ist hier generell die Einbringung fremder DNA in eine Zelle gemeint. Die Methoden dafür sind gut etabliert und können in für den Fachmann bekannter Weise durchgeführt werden (z. B. Sambrook et al. 1989, Potrykus I (1991) Annu. Rev. Plant Biol. Plant Mol. Biol. 42:205-225, Christou P (1993) Curr. Opp. Biotech. 4:135-141).

Ebenso werden Vektoren beschrieben, welche die DNA-Sequenz der vorliegenden Erfindung oder Teile der Sequenz in funktioneller Kombination mit Promotoren, oder anderen regulativen Elementen, welche in einer Wirtszelle aktiv sind, enthalten. In einer bevorzugten Ausführung handelt es sich bei diesen regulativen Elementen um Nukleinsäuresequenzen, welche in Ciliaten, insbesondere Tetrahymena, funktionell aktiv sind.

Ferner werden in der vorliegenden Erfindung Organismen beschrieben, welche die beschriebene Delta-6-Desaturase kodierende Sequenz rekombinant exprimieren. Dadurch besteht neben der Möglichkeit der Produktion von $\Delta 6$ -PUFAs in diesen Organismen z. B. auch die Möglichkeit die rekombinante delta-6-Desaturase oder Teile davon durch Standardmethoden der Proteinreinigung (z. B. Ausubel et al. 1995) zu isolieren. Vektoren für eine Expression der delta 6-Desaturase kodierenden Sequenz in verschiedenen Organismen können nach dem Fachmann bekannter Weise

hergestellt werden. Detaillierte Informationen über geeignete Promotoren finden sich z.B. in Sambrook et al. (1989), Goeddel, ed. (1990) *Methods in Enzymology* 185 Academic Press, und Perbal (1988) *A Practical Guide to Molecular Cloning*, John Wiley and Sons, Inc.. Solche Vektoren enthalten vorzugsweise Sequenzelemente, welche die Expression beeinflussen, wie Promotoren, Enhancer-Elemente, "upstream" aktivierende Sequenzen etc.. Für die Expression eignen sich sowohl induzierbare als auch konstitutive Promotoren, oder z. B. gewebespezifische Promotoren. Für die Expression in pflanzlichen Zellen eignet sich z. B. der "cauliflower mosaic virus" (CaMV) 35S Promoter (Restrepo et al. (1990) *Plant Cell* 2 987) oder z. B. Promotoren, die bei der Samenentwicklung aktiviert werden.

Vorzugsweise handelt es sich bei den benutzten Vektoren um Shuttle-Vektoren (Wolk et al. (1984) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1561-1565 and Bustos et al. (1991) *J. Bacteriol.* 174, 7525-7533).

In einer bevorzugten Ausführungsform wird die erfindungsgemäße Nukleinsäure unter Kontrolle eines starken Promotors (wie z. B. dem Tetrahymena Tubulin-Promoter, Gaertig et al. 1999) in Tetrahymena exprimiert. Die Transformation kann vorzugsweise nach Gaertig et al. 1999 *Nature Biotech.* 17: 462-465 (oder z. B. nach Gaertig & Gorovsky (1992) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89:9196-9200) beschriebenen Methoden erfolgen. Als regulative Elemente für die Expression können z. B. die Promotoren von α - oder β -Tubulin aus Tetrahymena thermophila benutzt werden. Die transformierten Tetrahymena werden in selektiven Medien identifiziert, angereichert und kultiviert. Aus den Zellen können die Lip(o)ide nach Standardmethoden isoliert werden (z.B. Dahmer et al., (1989) *Journal of American Oil Chemical Society* 66, 543). Die Methyl ester der Fettsäuren können durch Gaschromatographie analysiert werden.

Die in der vorliegenden Erfindung beschriebenen isolierte Nukleinsäuren oder Teile daraus können auch zur Isolierung verwandter Gene aus anderen Organismen, insbesondere z. B. aus anderen Protisten, insbesondere Ciliaten, benutzt werden. Für die Isolierung homologer Gene kann die erfindungsgemäße Nukleinsäure oder Teile

davon als Sonde eine Probe eingesetzt werden. Durch die Hybridisierung der Probe an isolierte Nukleinsäure aus anderen Organismen können homologe Nukleinsäure-Sequenzen identifiziert und isoliert werden. Die Markierung der Probe kann in einer für den Fachmann bekannten Weise durchgeführt werden (Ausubel, Sambrook (supra)). Für die Markierung der Probe eignen sich z.B. radioaktive Nukleotide oder Nukleotide die mit detektierbaren Molekülen wie z.B. fluoreszierenden Molekülen, Digoxigenin, Biotin, magnetischen Molekülen oder Enzymen verknüpft sind. Die Identifizierung und Isolierung homologer DNA-Sequenzen erfolgt durch den Nachweis der Markierung nach einer Hybridisierung der Probe an heterologe DNA. Für die Suche nach homologen Sequenzen bieten sich cDNA-Banken oder genomische Banken an. Für den Nachweis homologer Sequenzen eignen sich darüber hinaus Southern und Northern-Blots. Alternativ kann homologe DNA, die mit der markierten Probe hybridisiert, auch durch selektives Zurückhalten der markierten Probe (z.B. mit Hilfe eines Magneten) isoliert werden.

Die Isolierung und Klonierung homologer Gene durch Kreuzhybridisierung kann durch dem Fachmann bekannte Methoden, wie sie z. B. in Ausubel et al. (1995, *Current Protocols in Molecular Biology*, Green Publishing Associates, New York) oder Sambrook et al. (1989, *Molecular Cloning*) beschrieben sind, erfolgen.

Auf der Basis der isolierten DNA-Sequenz und der dadurch kodierten Proteinsequenz können zudem Oligonukleotide entworfen werden, mit deren Hilfe homologe Nukleinsäuresequenzen mittels Polymerasekettenreaktion (PCR) amplifiziert werden können.

Eine weitere Möglichkeit zur Isolierung homologer Proteine besteht in der Detektion mit spezifischen Antikörpern gegen das durch die Sequenz der vorliegenden Erfindung kodierten Protein oder Teile davon (z. B. Peptid-Antikörper).

Beschreibung der wichtigsten Sequenzen und Figuren

SEQ ID Nr. 1: Nukleotidsequenz der delta 6-Desaturase kodierenden cDNA- der delta 6-Desaturase von *Tetrahymena thermophila*. Start- und Stop-

5 Codon sind hervorgehoben.

SEQ ID Nr. 2: aus der SEQ ID Nr. 1 abgeleitete Proteinsequenz der *Tetrahymena* delta 6-Desaturase, unter Berücksichtigung des speziellen Ciliaten-Codon-Gebrauchs (Wuitschick JD, Karrer KM (1999), oder CUTG (Codon usage tabulated from Genbank):
<http://www.dna.affrc.go.jp/~nakamura/CUTG.html>).

SEQ ID Nr. 3: genomische Nukleotidsequenz der delta 6-Desaturase von *Tetrahymena thermophila*.

Figur 1: Schematische Darstellung der PUFA-Biosynthese.

15 Figur 2: Ergebnis eines BLASTP - Datenbank - Vergleichs der Proteinsequenz gemäß SEQ ID Nr. 2 mit Proteindatenbanken.

Figur 3: Alignment der Proteinsequenz gemäß SEQ ID Nr. 2 mit bekannten Desaturasen.

20 Figur 4: Multiples Alignment der Polypeptidsequenz gemäß SEQ ID Nr. 2 aus *Tetrahymena* mit bekannten Desaturasen. Die Histidin-Boxen sowie das konservierte HPGG-Motiv aus der Cytochrom b5 Domäne sind unterstrichen.

Figur 5: Schematische Darstellung der Genstruktur der delta 6-Desaturase aus *Tetrahymena* gemäß SEQ ID Nr. 1 und 3.

25

BEISPIEL

Die nachfolgenden Beispiele dienen zur Erläuterung der Erfindung, ohne die Erfindung auf diese Beispiele einzugrenzen.

5 BEISPIEL 1:

Organismen und Kultivierungsbedingungen

Tetrahymena thermophila (B1868, CU428.2 VII und B2086.1 II, CU522) wurden in Neff-Medium (0,25% Proteose Peptone, 0,25% Hefe Extrakt, 0,55% Glucose, 33 µM FeCl₃, 250 µg/ml Penicillin G und Streptomycinsulfat, 1,25 µg/ml Amphotericin B, nach Cassidy-Hanley, 1997) bzw. in 1 x PPYS-Medium (1% Proteosepeptone, 0,1% Hefeextrakt, 0,003 FeCl₃, nach Yu et al., 1988), bzw. 2 x PPYS-Medium mit 0,5% Glucose bei 25 °C in Erlenmeyerkolben unter ständigem Schütteln (100 U/min) kultiviert.

Plasmide und Phagen wurden in *E. coli* XL1-Blue MRF' vermehrt und selektiert. Die Kultivierung der Bakterien erfolgte unter Standardbedingungen in LB- und NZY-Medium, mit Antibiotika in Standardkonzentrationen (Sambrook et al. (1989) Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring, New York).

20 BEISPIEL 2:

Herstellung einer *Tetrahymena thermophila* cDNA-Bibliothek

Gesamt RNA aus *Tetrahymena thermophila* wurde nach der Guanidinthiocyanat/Phenol/Chloroform Methode isoliert. (Chomzynski & Sacchi (1987) Anal. Biochem. 161: 156-159). Aus der Gesamt-RNA wurde die mRNA mit Hilfe von Oligotex-dT-

25 Kügelchen (Qiagen) isoliert. Die Synthese der cDNA erfolgte nach dem Stratagene ZAP Express cDNA Synthesis and Cloning Kit. Nach Ligation der EcoR I-Adapter und Verdau mit Xho I wurde die DNA über ein Agarosegel aufgetrennt und Größensortiment fraktioniert (S: 500 - 1500 bp, B: größer 1500 bp). Die DNA wurde aus dem Gel isoliert (Qiaquick Gel Extraktion Kit, QIAGEN) und in den Eco RI und Xho I geschnittenen ZAP Express Vektor ligiert. Die ligierte DNA wurde in-vitro in Phagen verpackt (Stratagene Gigapack III Gold) und die Phagen wurden in *E. coli* XL1-Blue MRF' vermehrt. Die S-cDNA-Bank enthielt ca. 5 x 10⁵ Klone mit einer durchschnittlichen

Insertgröße von 1,1 kb, die B-cDNA-Bank enthält ca. 6.000 Klone mit einer durchschnittlichen Insertgröße von 2 kb.

BEISPIEL 3:

5 RT-PCR mit delta 6-Desaturase spezifischen Primern

Durch Sequenzvergleiche bekannter Desaturasen konnten konservierte Bereiche identifiziert werden. Für die besonders stark konservierten Bereiche

WWKWNHNAHH und GGLQFQIEHHLFP wurden unter Berücksichtigung des besonderen Ciliaten-Codon- bzw. *Tetrahymena*-Codon-Gebrauchs (Martindale, J.

10 Protozool. 36,1: 29-34, 1989; CUTG, (Codon Usage Tabulated from Genbank):

<http://www.dna.affrc.go.jp/~nakamura/CUTG.html>) PCR-Primer entworfen.

Primer 1 (sense): 5'-TGGTGGAARTGGAMNCAYAA-3',

Primer 2 (antisense): 5'-CGDGGRAANARRTGRTGTTTC-3'.

15 100 ng isolierte mRNA wurde für die Erststrangsynthese mit AMV-Reverser Transkriptase (Boehringer Mannheim) eingesetzt. Die Reaktion erfolgte nach dem Hersteller-Protokoll in 20 µl Volumen: 50 mM Tris-HCl (pH 8,5), 8 mM MgCl₂, 30 mM

KCl, 1 mM DTT, 1 mM dNTPs, 2 pmol Oligo-dT-Ankerprimer (5'-

GACCACGCGTATCGATGTCGACT(16)V-3'), 2 units AMV-Reverse Transkriptase, 60 min. bei 55 °C, anschließend 10 min 65 °C. 1/10 dieser Erststrangreaktion wurde

20 für die PCR eingesetzt. Die PCR erfolgte in 25 µl Volumen mit: 1 x Qiagen HotStarTaq PCR-Puffer (QIAGEN), pH 8,7 (20 °C), je 10 pmol der delta 6-Desaturase spezifischen Primer, je 200 µM dNTPs, 1,5 mM MgCl₂, 1 unit HotStarTaq-Polymerase (Qiagen). Die PCR wurde unter folgenden Bedingungen durchgeführt: Anfangsnaturierung bei 95 °C für 15 min, anschließend folgten 35 Zyklen mit jeweils 94 °C

25 für 30 sec, 45 °C für 30 sec, 72 °C für 1 min. Abschließend 10 min 72 °C. PCR-Fragmente wurden durch T/A Klonierung (Invitrogen) in den Vektor pCR 2.1 ligiert und in *E. coli* TOP10F' (Invitrogen) vermehrt. Von positiven Klonen wurde Plasmid-DNA isoliert (Qiaprep Spin, QIAGEN) und sequenziert.

BEISPIEL 4:

Isolierung der vollständigen delta 6-Desaturase kodierenden cDNA

Auf der Basis der so ermittelten Sequenz wurden neue Oligonukleotide für die PCR entworfen. Primer d6-F (sense): 5'- GGAATCACAATCAACATCATATGTTACAC -3',

Primer d6-R (antisense): 5'- CTTTCGTCCTTTAGAAATGTTGTTGTGAAC -3'

Die Isolierung der vollständigen delta 6-Desaturase kodierenden DNA erfolgte durch

5 PCR mit diesen Primern in Kombination mit Vektor-spezifischen Primern (T3 und T7)

aus der cDNA-Bank. Von der cDNA-Bank wurden 2 µl (10⁵ pfu/µl) für eine PCR (s.o.)

eingesetzt. Die PCR erfolgte abweichend von den oben angegebenen Bedingungen

nach folgendem Protokoll: 15 min 95 °C Denaturierung, anschließend 35 Zyklen mit

20 sec. 94 °C, 20 sec 57 °C, 1 min. 72 °C. Abschließend 10 min 72 °C. Die PCR

10 Produkte wurden mit den auch für die PCR eingesetzten Primern sequenziert. Auf

der Basis der so gewonnenen Sequenzinformationen wurden neue Primer entworfen, die am 5'- und 3'-Ende der cDNA-Sequenz lagen.

Primer d6-F: AGTAAGCAAACATAAATTTAAAAACAAGC

Primer d6-R: GTTAAGACTGTTTCTCAGATTAAAAAG

15 Mit Hilfe dieser Primer konnte die vollständige cDNA-Sequenz durch PCR (PCR-Bedingungen s.o.) amplifiziert und isoliert werden.

BEISPIEL 5:

Herstellung einer *Tetrahymena thermophila* genomischen DNA-Bibliothek

20 Genomische DNA wurde mit Hilfe der Phenol/SDS-Methode (Ausubel et al. 1995)

aus *Tetrahymena* isoliert und mit Eco R I geschnitten. Die geschnittene DNA wurde

in einen ebenfalls Eco R I geschnittenen Lambda-Vektor (Zap Express, Stratagene)

ligiert. Die weitere Durchführung entsprach der Vorgehensweise bei der cDNA-

Bibliothek.

25

BEISPIEL 6:

Isolierung der genomischen Sequenz der delta 6-Desaturase

Die genomische Sequenz der delta 6-Desaturase wurde mit Hilfe der PCR ermittelt.

Zum einen wurde mit Primern vom 5'- und 3'-Ende der cDNA aus genomischer DNA

30 ein ca. 2200 bp großes PCR-Produkt erzeugt, welches die gesamte kodierende Sequenz und Introns enthielt.

d6-5'-F: AGTAAGCAAACATAAATTTAAAAACAAGC;

d6-3'-R: GGTCCTTCATGAATCTTAAGGTTCCACTTC.

Um flankierende Sequenzen des delta 6-Desaturase Gens zu isolieren wurde das Genome Walker System (Clontech) benutzt. Mit Hilfe der universellen Primer aus diesem System und spezifischen Primer auf der Basis der ermittelten delta 6-

Desaturase Sequenz konnten flankierende Bereiche des delta 6-Desaturase Gens aus Tetrahymena isoliert werden.

d6-5'-R: CTTAAGTCTTATCAACTCCCATAATGC

d6-3'-F: GAAGTGGAACCTTAAGATTCATGAAGGACC

10 BEISPIEL 7:

Herstellung der Expressionskonstrukte

Die Vektoren für die gezielte Überexpression der delta 6-Desaturase wurden mit Hilfe von Fusions-PCR hergestellt. Dazu wurden die gewünschten DNA-Fragmente mit Primern amplifiziert, die zusätzlich zum sequenzspezifischen Bereich ca. 15-20 Nukleotide am 5'-Ende besaßen, die sequenzspezifisch zu der Nukleotidsequenz waren, mit der die Sequenz fusioniert werden sollte. Nach Reinigung der einzelnen PCR-Produkte konnte die Fusion der Fragmente durch PCR erreicht werden.

15 BEISPIEL 8:

Herstellung von Knock-out Konstrukten

Durch Fusions-PCR wurde in die genomische Sequenz der delta 6-Desaturase ein Markergen (z. B. Neomycin-Resistenz) eingefügt und dadurch die delta 6-Desaturase zersört. Durch homologe Rekombination wurde das normale Gen durch dieses Konstrukt ersetzt. Durch Selektion auf Neomycinresistenz konnten transformierte Zellen identifiziert werden. Durch GC-Analyse wurde das veränderte Fettsäurespektrum analysiert.

20 BEISPIEL 9:

Elektrotransformation von *Tetrahymena* nach Gaertig & Gorovsky, (1995) DNA-Mediated Transformation in *Tetrahymena*. Methods in Cell Biology, Vol.47, Chapter 80, Academic Press.

Tetrahymena unterschiedlichen Paarungstyps (CU428.2 VII und B2086.1 II) wurden jeweils in 75 ml Neff-Medium für 12-16 h bei 30 °C unter Schütteln (120 Upm) in einem 500 ml Erlenmeyerkolben kultiviert. Bei einer Zelldichte von $1-6 \times 10^5$ Zellen/ml wurden die Zellen 5 min. bei Raumtemperatur zentrifugiert (1100 g). Die Zellen wurden dreimal mit 50 ml 10 mM Tris-HCl (pH 7,5) gewaschen und schließlich in 50 ml 10 mM Tris-HCl (pH 7,5) resuspendiert und mit 200 µl PenStrep (5000 units Penicillin G, 5 mg/ml Streptomycin) und 10 µl Amphotericin (2,5 mg/ml) versetzt. Die Zellen wurden bei 30 °C unter Schütteln inkubiert. Nach ca. 6-8 h wurden beide Kulturen mit 10 mM Tris-HCl (pH 7,5) auf 3×10^5 Zellen/ml verdünnt und von beiden Kulturen die gleiche (absolute) Zellzahl in einem Erlenmeyerkolben gemischt. Die Zellen wurden bei 160 Upm geschüttelt bei 30 °C inkubiert. Nach 10-18 h wurde der Schüttler angehalten (Beginn der Konjugation) und nach weiteren 4-6 h wurde die Effizienz der Konjugation bestimmt.

Für eine erfolgreiche Transformation sollte die Konjugationseffizienz (KE) mindestens 80% betragen. Die Zellen wurden bei 1100 g für 5 min. bei Raumtemperatur

zentrifugiert, mit 10 mM HEPES (pH 7,5) gewaschen und in 1 ml 10 mM HEPES (pH 7,5) resuspendiert (ca. 3×10^7 Zellen/ml). 125 µl Zellsuspension wurden mit 125 µl

Vektor-DNA (50 µg) in einer 0,2 cm Küvette gemischt. Die Elektroporation wurde mit einem Gene Pulser von BioRad mit Capacitance Extender II unter folgenden Bedingungen durchgeführt: 250 V (entspricht 1125 V/cm), (276 V = 1380 V/cm), C = 275 µF, R = 13 Ω Spannungsspeak bei 255 V, Pulslänge $\tau = 4$ ms. Nach 1 min bei Raumtemperatur wurde der Transformationsansatz in 20 ml Neff-Medium überführt und 24 h bei 30 °C und 60 Upm inkubiert. Durch Zugabe des Selektionsmarkers konnten die positiven Transformanten selektiert werden.

Alternativ wurde die Transformation von *Tetrahymena* durch Mikropartikelbeschuss nach Cassidy-Hanley et al. 1997, Gaertig et al. 1999 durchgeführt.

Patentansprüche:

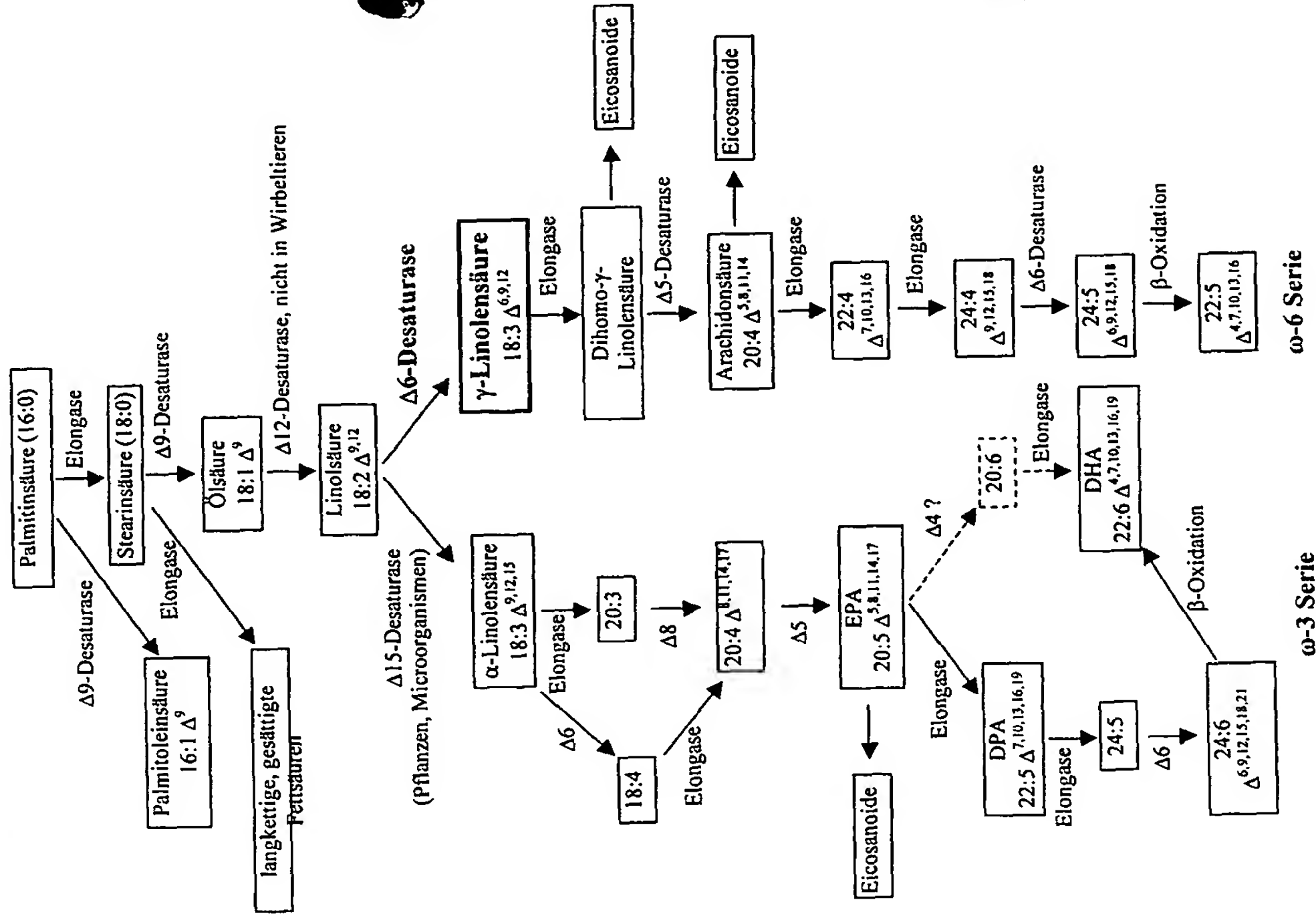
HOE 1999/F046

1. Nukleinsäure kodierend für delta 6-Desaturase aus Tetrahymena mit einer Aminosäuresequenz gemäß SEQ ID Nr. 2 oder ein funktionelle Variante davon, und Teile davon mit mindestens 8 Nukleotiden, wobei SEQ ID Nr. 1 Teil des Anspruchs ist.
2. Nukleinsäure nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß die Nukleinsäure aus einem Ciliaten erhalten wird.
3. Nukleinsäure nach Anspruch 1 oder 2, dadurch gekennzeichnet, daß die Nukleinsäure aus Tetrahymena thermophila erhalten wird.
4. Nukleinsäure nach Anspruch 1 - 3, dadurch gekennzeichnet, daß die Nukleinsäure eine DNA oder RNA, vorzugsweise eine doppelsträngige DNA, ist.
5. Nukleinsäure nach einem der Ansprüche 1 bis 4, dadurch gekennzeichnet, daß die Nukleinsäure eine DNA mit einer Nukleinsäuresequenz gemäß SEQ ID Nr. 1 von Position 33 bis Position 1091 ist.
6. Nukleinsäure nach einem der Ansprüche 1 bis 5, dadurch gekennzeichnet, daß die Nukleinsäure eine oder mehrere nicht kodierende Sequenzen enthält.
7. Eine isolierte Nukleinsäure nach einem der Ansprüche 1 bis 6 gemäß SEQ ID Nr. 3 oder ein funktionelle Variante davon, und Teile davon mit mindestens 8 Nukleotiden, wobei SEQ ID Nr. 3 Teil des Anspruchs ist.
8. Nukleinsäuren nach einem der Ansprüche 1 - 7, dadurch gekennzeichnet, daß die Nukleinsäure in einem Vektor, vorzugsweise in einem Expressionsvektor, enthalten ist.

9. Expressionstektoren nach Anspruch 8, dadurch gekennzeichnet, daß die Nukleinsäure in funktioneller Kombination zu einem konstitutiven und / oder induzierbaren Promoter und optional einem Terminationssignal steht.
10. Verfahren zur Herstellung einer Nukleinsäure nach einem der Ansprüche 1-7, dadurch gekennzeichnet, daß die Nukleinsäure chemisch synthetisiert oder anhand einer Sonde aus einer Genbank isoliert wird.
11. Polypeptid mit einer Aminosäuresequenz gemäß SEQ ID No. 2 oder eine funktionelle Variante davon, und Teile davon mit mindestens 6 Aminosäuren.
12. Verfahren zur Herstellung eines Polypeptids gemäß Anspruch 11, dadurch gekennzeichnet, daß eine Nukleinsäure gemäß einem der Ansprüche 1-7 in einem geeigneten Expressionssystem oder Wirtorganismus exprimiert wird.
13. Antikörper gegen ein Polypeptid gemäß Anspruch 11.
14. Transgener Organismus enthaltend eine Nukleinsäure nach einem der Ansprüche 1 bis 9.
15. Transgener Organismus nach Anspruch 11 ausgewählt aus Pflanze oder Cilienten.
16. Verwendung der Nukleinsäuren gemäß der Ansprüche 1-7 und/oder Polypeptide gemäß Anspruch 11 zur funktionellen Expression und / oder Anreicherung Überexpression von delta 6 Desaturase abhängigen Fettsäuren in einem Wirtorganismus.

Die vorliegende Erfindung betrifft Nukleinsäure(n) aus Tetrahymena die für eine cili-
atenspezifische delta 6-Desaturase kodiert, welche an der Biosynthese von kom-
merziell wertvollen mehrfach ungesättigten Fettsäuren (sog. PUFA engl.: polyun-
saturated fatty acids) beteiligt ist. Die erfindungsgemäße Nukleotidsequenz und die
daraus erhaltene Polypeptidsequenz zeigen eine überraschend geringe Sequenzi-
denität zu anderen bekannten natürlichen Desaturasen. Die Erfindung betrifft ferner
die Verwendung der Nukleinsäure(n) zur Überexpression in Ciliaten, vorzugsweise
Tetrahymena, insbesondere Tetrahymena thermophila.

Figur 1



Figur 2

BLASTP 2.0.0.8 [Jan-05-1999]
Reference: Altschul, Stephen F., Thomas L. Madden, Alejandro A. Schaffer, Jinghui Zhang, Zheng Zhang, Webb Miller, and David J. Lipman (1997), "Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs", Nucleic Acids Res. 25:3389-3402.

Query= T.thernophila, delta-6-Desaturase (352 letters)
Database: /LION/data/db/fast/nrdb
387,705 sequences; 119,829,732 total letters

Sequences producing significant alignments:		
	Score	E
	(bits)	Value
trembl AF078796 AF078796_1 gene: "des-5"; product: "delta 5 fat...	79	4e-14
trembl AF031477 AF031477_1 product: "delta6-fatty-acid-desatura...	79	4e-14
trembl Z81122 CET13F2_1 gene: "T13F2.1"; Caenorhabditis eleg...	78	1e-13
trembl Z70271 CEW08D2_2 gene: "W08D2.4"; Caenorhabditis eleg...	78	1e-13
trembl AF005096 AF005096_1 product: "desaturase/cytochrome b5 p...	70	3e-11
trembl AJ222980 PPAJ2980_1 gene: "des6"; product: "delta6-acyl-...	69	6e-11
trembl U79010 BOU79010_1 product: "delta 6 desaturase"; Bora...	67	2e-10
trembl AC005397 AC005397_14 gene: "T3F17.14"; product: "putativ...	67	2e-10
trembl AF007561 AF007561_1 product: "delta 6-desaturase"; Bora...	66	4e-10
tremblnew AF126799 AF126799_1 product: "delta-6 fatty acid desa...	64	2e-09
tremblnew AF126798 AF126798_1 product: "delta-6 fatty acid desa...	63	3e-09
trembl AF031194 AF031194_1 gene: "S276"; product: "S276"; Trit...	62	6e-09
tremblnew AB021980 AB021980_1 product: "delta-6 fatty acid desa...	62	6e-09
tremblnew AL078610 SCH35_12 gene: "SCH35.42c"; product: "putati...	62	8e-09
trembl AJ224160 BNAJ4160_1 gene: "sld1"; product: "delta-8 sphi...	60	2e-08
trembl AC004770 AC004770_2 product: "BC269730_2"; Homo sapiens...	60	3e-08
trembl AJ224161 ATAJ4161_1 gene: "sld1"; product: "delta-8 sphi...	59	6e-08
tremblnew AL050118 HSM800210_1 gene: "DKF2p586C201"; product: "...	57	2e-07
trembl AB022097 AB022097_1 product: "delta 5 fatty acid desatur...	57	2e-07
trembl X87143 HACYTB5RN_1 product: "cytochrome b5 containing fu...	50	2e-05
trembl Y08460 IMMDES_1 gene: "Mdes"; product: "Mdes protein"; ...	50	3e-05
trembl AF001394 AF001394_1 product: "fatty acid desaturase/cyto...	46	4e-04
trembl AF002668 HSAF2668_1 product: "MLD"; Homo sapiens putati...	46	5e-04
swiss Q08871 LLCD_S3 YNY3 LINOLEOYL-COA DESATURASE (EC 1.14.99.25...	43	0.003

Figur 3A

>aageneseq|W95504|Mortierella alpina delta 6 desaturase. Length = 457
Score = 89.7 bits (219), Expect = 4e-18
Identities = 102/422 (24%), Positives = 152/422 (35%), Gaps = 88/422 (20%)
Query: 9 EIVLENKPELLNEVKFIYKDYDCTEYAKSNKHPGGLNLFNLFIDEKQDLTEYFRTLHS 68
E + E K + + I + YD E+ HPGG L +D T+ F T H
Sbjct: 19 EALNEGKDAEAPFLMIIDNKVYDVREFVPD--HPGGSVILT---HVGKDGTOVFOTFHP 73
Query: 69 KQALKILKSPFKTAKQEETE-SSKRFSLKILKHLKHLFEPNWPTEIG-----LFLTFTTFL 123
+ A + L + F + + + + F+ +KL+ LF+ + F +F L
Sbjct: 74 EAAWETLANFYVDIDESDRDIKNDDFAAEVRKLRITLFSQSLGYDYSSKAYYAEKVSFNLC 133
Query: 124 VTGCLT---QKW-----YFSIPLLVLMQIISGWIHSHMNNRNPILR----KEALVY 168
+ G T KW S LL L GW+ H H++ R F
Sbjct: 134 IWGLSTVIVAKWGQSTLANVLSAALLGLFWQCGWLAHDFLHQVDFQDRFWGDLFGAFL 193
Query: 169 APLCGGFSNKMGRKHNQHMMFTNNILKDEDIQ-HDYKLMQ----- 208
+C GFS+ WW KHN HH N +D DI H W
Sbjct: 194 GVCQGFSSWWKXNTHHAAPNVHGEDPDIDTHPLTWSEHALEMSDVPDEELTRMW 253
Query: 209 -----FP---FLFLKWKLDLSIL-----ASYFEFEGIFLALHWV 238
FP F L W L SIL E + LA+HW
Sbjct: 254 SRENVLNQTWFYFPILSFARLSWCLQSILFLVLPNGQAHKPSGARVPISLVEQSLAMHMT 313
Query: 239 LLENQNEYIV-----ILSELVAGFSESASILVGNHEN--EMKFERRITLFFFEHQI 286
F + ++S+ + G A + NH + E + + FF QI
Sbjct: 314 WYLATMELFIKDPVNMVLYVLSQVCGNLLAIVFSLNHNHGMFVSKCAVDMDFFTKQI 373
Query: 287 AASRYAEHDIFFSLLIMGMQYOTEHHFFQIPYRPLRKARVIAEELKKNLKIHEGPI 346
R+ +F+ GG+ YQ EHH FP +P + K + + KK+N++ H +
Sbjct: 374 ITGRD-VHPGLFANWFTGGLNYQIEHHLFSPMRHFSKIQPAVETLCKKYNVRYHTGM 432
Query: 347 FE 348
E
Sbjct: 433 IE 434

Figur 3B

>trembl|AF031477|AF031477_1 product: "delta6-fatty-acid-desaturase";
Caenorhabditis elegans delta6-fatty-acid-desaturase mRNA, complete cds. //:gp|AF031477|3089520
product: "delta6-fatty-acid-desaturase"; Caenorhabditis elegans delta6-fatty-acid-desaturase
mRNA, complete cds. Length = 443
Score = 79.2 bits (192), Expect = 4e-14
Identities = 100/390 (25%), Positives = 132/390 (33%), Gaps = 95/390 (24%)
Query: 41 KHPGGLNLFIDEKQDLTEYFRTLH--SKQALKILKSPFKTAKQE--ETESSKR--- 93
KHPGG D T F H S QA K L K G E + + KR
Sbjct: 28 KHPGCAVIEQY---RNSDATHIFHAFHEGSSQAVKQLDLKKHGEHDEFELEKLEKRLDK 84
Query: 94 -----FSILKKKLKH--LFEPNWPTEIGLFTTTFTLVFGCLTQ 130
F L++KL L + N + ++T ++ Q
Sbjct: 85 VDINVSAYDVSVQAQEKKMWSEFEKLRKLDHDDGLMKANETTYFLFKRAISTLSINAFAYLQ 144
Query: 131 K--WYF-SIPLLVLMQIISGWIHSHMNNR-----NPILRKFAIVYAPLCGFSKNKWKGRK 183
WY S LL L GW+ H H + P+ +L + GFS WW K
Sbjct: 145 YLGWYITSACLLALAWQOFCGLTDFEFCQOPTKRNPLNDTISLFFCGNFGFSRDMWKDK 204
Query: 184 HNOHHMFTNNILKDEDI-----QHDYKLMQFPFLF 213
HN HH TN I D DI OH Y P L
Sbjct: 205 HNTHTAATNVIDHGDGDLAPLFAFIPGDLCKYKASFEKAILKIVPYQHLYFTANLPLMR 264
Query: 214 LKWKLDLSILASYE-----FEGIFLALHWVLLFNQNEYI-----VILS 251
W S+ + E +E + HW +F Q F + I+S
Sbjct: 265 FSWTQSGVQWFKENQMEYKYQRNAFWNAFVQFVQLFLLPLTWPLRVAYFIIS 324
Query: 252 ELIAGFFSASILVGNHENEMKF--ERRITLFFFEHQIAASRYAFHDIFFSLLIMGMQYQ 309
++ G A ++ NH + K+ RI F QI +RN L GG+ YQ
Sbjct: 325 QMGGGLLIAHVVTFNHNSVDKYPANSRLNNFAALQILTRNMTSPFFIDWL-WGGLNYQ 383
Query: 310 TEHHFFFPQIPFRLPKARVIAEELKKNL 339
EHH FP +P L + E K+ NL
Sbjct: 384 IEHHLFPTMPRCNLNACVYVKEWCKENNL 413

Figur 3C

>trembl|U79010|BOU79010.1 product: "delta 6 desaturase"; Borago officinalis delta 6 desaturase mRNA, complete cds. //:gp|U79010|2062403 product: "delta 6 desaturase"; Borago officinalis delta 6 desaturase mRNA, complete cds. Length = 448

Score = 67.1 bits (161), Expect = 2e-10
Identities = 100/414 (24%), Positives = 154/414 (37%), Gaps = 100/414 (24%)

5 Query: 6 TQEEIVLENKPELLNEKFIYKDYDCTEYAKSNKHPGGLNFNLFLDEKQDITEYFRT 65
T +E+ +K+ + YD +++ K HPGG L Q++T+ F
Sbjct: 10 TSDELKNDKP---GDLWISIQGKAYDVSDWVD--HPGGSFPLKSLAG--QEVTDATVA 62

10 Query: 66 LHSKQALKILKSPKTKAQEE---TESSK-----RFSILKKKHLKHLFEPNWPPIE 112
H K L F TC ++ +E SK + + KK +F I
Sbjct: 63 FHPASTWKNLDRF-FTGYLKDYSVSEVSKDYAKLVFEFSKMGLYDKRGHIMFATLCFIA 121

15 Query: 113 IGLFLITTF-TLFTVTCGLTQKWYESIPLVLMLQIISGHWGHSNMNHR---NFIILKFEALVY 168
+ ++ + LF G L FS L+ + I SGWIGH H + L KF ++
Sbjct: 122 MLEANSVYGLFCEGVLVH--LFGCLMGFLWIGSGWIGHGACHYMWVSDSLNKNKMGIF 179

20 Query: 169 APLC-GGFSNKNWGRKHQHHMFTNNILKDEDIQH----- 202
A C G S WW HN HH+ N++ D D++
Sbjct: 180 AANCLSGISIGWKNWNNHNAHACNSLEYDPLQYIFLVSSEKFFGSLTSHFYEKRLTF 239

25 Query: 203 -----DYKLWQFPFLKWLKSLASV-----YEFEGIFLALHWLL- 240
Y+ W F + +L+ + S +E G + W L
Sbjct: 240 DLSLRFFSVSYQHTFYPMCAARLNMVYQSLIMLTLRNVSYRAHELGLCLVFSIWPYL 299

30 Query: 241 -----FNQNFYIVILSELIAGF-----FSASILVGNHNEKFERITLFFFEHQ 285
+ + VI S + G FS+S+ VG + FE++ T +
Sbjct: 300 VSLCPNWRGIRMEVIAVSLVTGMQVQVSLNHFSSVYVGRKGNWFEKQ-TDGTLDIS 358

35 Query: 286 IAASRNAYAFHDFSLIMGCMQVQTEHFFQIPFYLPRKARVIAEELKKNWL 339
++ FH GG+Q+O EHH FP+P L K + E KK NL
Sbjct: 359 CFPWMDW-EH-----GGLQFQIERHLPKMPRCNLRKISPYVIELCKKNL 403

Figur 3E

>swiss|Q08871|LCLD_SNNY3_LINOLEOYL-COA_DESATURASE (EC 1.14.99.25)
(DELTA(6)-DESATURASE).//:trembl|L11421|SSD6DS.1 product: "delta-6 desaturase";
sp. delta-6 desaturase gene, complete cds. //:trembl|D90914|SSD914.112 gene: "des6"; product:
"delta-6 desaturase"; Synecocystis sp. PCC6803 complete genome, 16/27, 1991550-2137258.
//:pironly|S35157|S35157 Delta(6)-desaturase - Synecocystis sp.//:gp|D90914|1653589 gene:
"des6"; product: "delta-6 desaturase"; Synecocystis sp. PCC6803 complete genome, 16/27,
1991550-2137258. //:gp|L11421|349563 product: "delta-6 desaturase"; Synecocystis sp. delta-6
desaturase gene, complete cds. Length = 359

Score = 43.4 bits (100), Expect = 0.003
Identities = 63/288 (21%), Positives = 101/288 (34%), Gaps = 61/288 (21%)

5 Query: 120 FTLFVTCGLTQKWYFSPILVLMLQIISGHWGHSNMNHR---NP-ILRKFAVLVAPLCGGF 175
F LF + + L + + S +GH NHN NP I R + Y + G
Sbjct: 57 FVLFAPVFPVRLGCMVLATAAFAFSTFNVGHDANNHAYSSNPHNRVLGTYDFV--GL 114

10 Query: 176 SNKMWGRKHQ--HMFNTNNILKDEDIQHDYKLMQFPFL-----FLKWKLDLSILAS 224
S+ W +HN HH +TN + D +I D + P F W L +
Sbjct: 115 SSELWRYRHHYLLHHTYTNILGHQVEIHGDAVMSPEQEHVGIYRFOQFVINGLYLFIFP 174

15 Query: 225 YFEFEGIFLAL-----HWVLLFNQNFYIVILS-----ELIAGFFSASILVG 265
Y+ ++L L H + F +L L GF +L+G
Sbjct: 175 YWFLYDVVLNKGKYGKHDKIPFPQPLELASLIGIKLMLGYVFGFLALGFSIPEVLIG 234

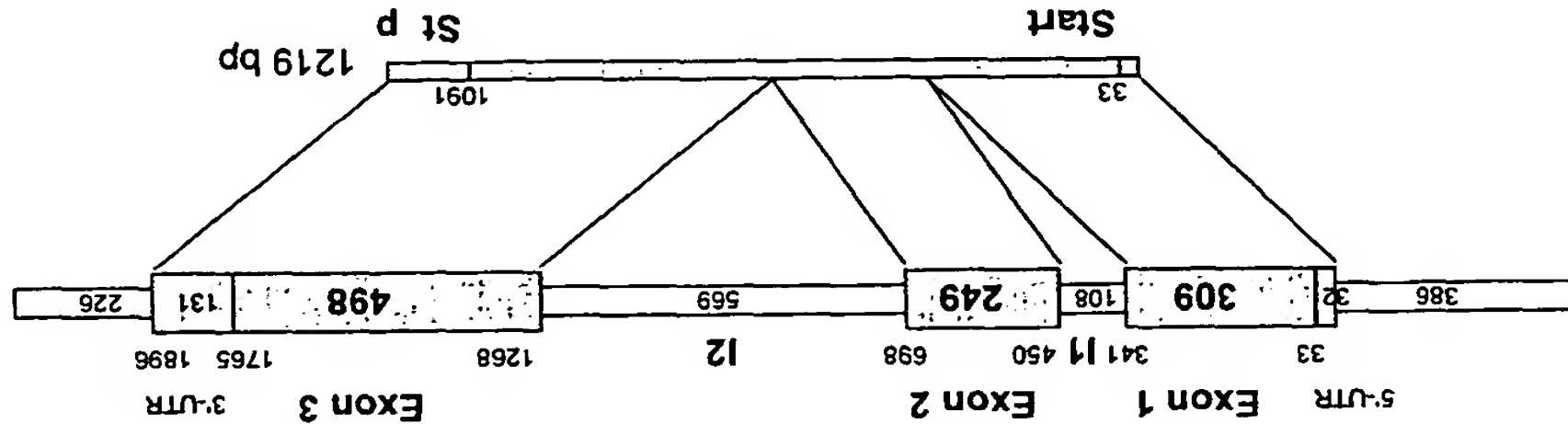
20 Query: 266 NHENEMKFERRI-TLPFFEH-----QIAASRNAYAFHDFISL 300
M + + T+ H QI + N+A ++ F
Sbjct: 235 ASVTYMYGIVVCTIFMLAHVLESTEFLLPDGSGAIDDEMAICQIRTTANFATNPEWN 294

25 Query: 301 LINGCMQYQTEHFFPQIPFYLPRKARVIAEELKKNLKIHEGPIFE 348
GG+ +Q HH FP I P+ II + ++ ++ P F+
Sbjct: 295 WFCGGLNHQVTHLLFPNICHITHYPQLENLIKDVQCEFGVEYKYPTFK 342

Figur 4

5	M.alpina	1	-----MAAAPSVRTETRAEVLNAAALNAGGKDAEAPFLAIENAVDRAREVP--DHPGG
	C.elegans	1	-----MVRQOE-----HEPFFKIFGWCQIDDAALR-SHPGG
	B.officinalis	1	-----MAAQIKKIVYTSDEIKKHD-----PGLNLSHGGAAVDSWVK--DHPGG
	M.musculus	1	1 MGKGGNOGEGSTERQAPNPTFRWEICKHN--LRTRMDVITIRVYVNRASQ--RHPPG
	T.thermophila	1	1 -----MGVDKQTQEEVLNAPELINEVKEIKYKDEYICIDVAKSNKHPGG
10	M.alpina	54	SVILTHVVK--GGIVVDTERPEA-----AETANAYV--DIDESRDKND-----D--
	C.elegans	34	-SAITATKNN--GATVVEHTHFGSKEAYQALTELKKECTQEP--IPDKDDPIKGIDDV
	B.officinalis	45	SFPFKSLAQ--EVIDAFVAFHPAS-----TFNNDKQFTYYLKQYSVSVS-----
	M.musculus	57	HRVIGHNSGE--GTDDEFAEHLDDLD--FVGEFKPLLI--ELAPPS--ERG-----
15	T.thermophila	46	LNELNLEIDEKQELTEVEKTLISKQ-----ALPDKSPKTKAKQEE--TESS-----
20	M.alpina	100	-----FAAEV-----KATLFQSELYZSSKAYAKKSENLCVGC--SVVAKK
	C.elegans	91	NGTFTNISEKPSAQINKSFDPMRVRAESLMGSPLETKRKI-----DETFFTHFAFY
	B.officinalis	91	-----KYP-----KVFEEFSKGLM--KKGHMFAT--LCFIAMLFAMSYSVL
	M.musculus	105	-----KSSQITDEFP-----ALKTAEDNLLKTNHLEFLLSHIIVES--AWELISYE
	T.thermophila	92	-----KP-----FSILKKK--KHLFEPNPIE-----GLFTTFTFVT
25	M.alpina	146	QOTSTLANVLSAALLGLFQ--CQWLAHLALHOFQDF--EWGDFEQAFTGVCQ-----
	C.elegans	146	LOYHTYY--PSAILGGAAC--LWLIHEFAH--HOLEKNE--YADLASVAVENFLQVSHFNN
	B.officinalis	133	FCEGVLVH--FGCQMLFI--SEVGHGAGYMYVSDSLKFKGIE--EANCIS-----
	M.musculus	155	GTGWIPY--LVAFELATSOA--AGWCHLVEGLSVYKKSIV--HVVHKEVIGH--K-----
30	T.thermophila	126	CLTQKW--YFIPDIVEAQIISWIGHSMN--NRNPILF-----KELVYVPLCG-----
35	M.alpina	199	GSSSSWKQCHITHHAA--FVHGDDP--IDTHLLTWSEHALEMESD--VPOEELTRMWSRF
	C.elegans	205	GSSSGGRKEQRRVHAA--VAGRGGLDIFVEYATVAEHLNNS--QDS-----WVMT
	B.officinalis	186	GISIGWVWNNH--AHIP--CSLEYDELLQYTFEIVSSKFGSLSHFYEKRLTFDSLSRF
	M.musculus	207	CASANWNNRHECHQAKETIEHKOPTIKSHVFLGEMQPLENG-----KKK-----LKYL
	T.thermophila	174	SPSKK--GRKH--QHHMFT--NLIKIE-----
40	M.alpina	257	MVLN--TWVEYPTISEARIS--CLOSILEVLNPGQAHKPSGAVPISIV--QSSAMHRTVYI
	C.elegans	256	LFRWQVHMTFMPFELRIS--LLOSLIFVQOMP--THYYDYEN--TAIYE--QVGSLSHGA--SL
	B.officinalis	246	FVSQCHWTEYPIICAA--RINMYQSHMLLTKR-----NVSYEA--QALLGCLFSLNYP
	M.musculus	258	PYNHCHETFEFLICFPIIPMYF--FYCIETWIS-----ER-----LWVDEFAWALSWE
	T.thermophila	201	-----QHDNKLWQPEEIF--K--DSIASYEEF-----GFLAHEVLLF
45	M.alpina	317	ATMFLFKDPVNM--LVYFELV--QAC--CNLAIT--FRRNANG--PVISKEEAVDMDEF--KQDII
	C.elegans	314	G-OLYEL--DSTR--IMP--ELAV--HL--G--FELSHV--TFHHYS--EKEK--ALLSN--MNSNYACI--IM
	B.officinalis	298	L-LVSCHE--NNGER--IMEVIA--LSPTG--EQOVQFSEH--HFS--SVVGG--PKGNM--PEK--TD
	M.musculus	305	RFEYTYL--F--GILGALV--FIRE--ESHWFVW--TQ--NHLV--EIDLDH--YRDM--SS--AA
50	T.thermophila	242	N-----QN--FYIVIL--ELIA--FFSASILVGI--HENEMK--ERE--F--TLPEF--EQ--IA
55	M.alpina	375	TGEPVH--PGLF--ANPT--GGLNYQIEHLL--FEP--PRH--ES--I--CA--ET--VY--V--R--HTG--MI
	C.elegans	371	TTTRNR--EGRFID--GLW--GGLNYQIEHLL--F--PRH--NT--V--E--H--K--K--E--A--A--N--G--P--M--V--D--D--Y--E
	B.officinalis	353	GLD--IS--QPP--MD--H--GG--L--Q--IEH--L--F--K--PR--C--L--R--E--S--Y--I--E--L--C--H--P--H--P--N--Y--A--S--F--S
	M.musculus	362	PLQ--VE--Q--S--F--N--D--W--S--H--H--Q--IEH--L--F--P--R--H--K--I--A--I--K--S--L--C--P--H--G--E--I--Q--E--K--P--L
	T.thermophila	288	ASRLYAFHDIE--SL--L--M--G--W--Y--Q--T--E--H--F--F--C--F--F--Y--E--F--P--A--R--V--I--A--E--L--F--M--I--K--I--H--E--G--P--F--E
60	M.alpina	434	EFTAEEVFS--INEVSKA--SK--K--Q--A--O-----
	C.elegans	430	TGFWEFE--EQEF--NIN--V--A--N--T--K--I--A-----
	B.officinalis	412	KANEV--TR--T--R--N--T--L--Q--R--D--T--E--P--L--P--K--N--L--V--E--A--L--H--T--H--G-----
	M.musculus	421	RALID--I--SS--L--K--S--E--L--M--D--A--Y--L--H--K-----
	T.thermophila	348	EKSHF-----
65			352

Struktur des $\Delta 6$ -Desaturase Gens



Figur 5

SEQ ID NR. 1:

SEQ ID

ID SEQ ID NR.1: DNA; 1219 BP.
SQ SEQUENCE 1219 BP; 420 A; 204 C; 182 G; 413 T; 0 OTHER;
COS: 33-1091

5
10
15
20
25
30
35
40
45
50
55
60
65
70
75
80
85
90
95
100
105
110
115
120
125
130
135
140
145
150
155
160
165
170
175
180
185
190
195
200
205
210
215
220
225
230
235
240
245
250
255
260
265
270
275
280
285
290
295
300
305
310
315
320
325
330
335
340
345
350
355
360
365
370
375
380
385
390
395
400
405
410
415
420
425
430
435
440
445
450
455
460
465
470
475
480
485
490
495
500
505
510
515
520
525
530
535
540
545
550
555
560
565
570
575
580
585
590
595
600
605
610
615
620
625
630
635
640
645
650
655
660
665
670
675
680
685
690
695
700
705
710
715
720
725
730
735
740
745
750
755
760
765
770
775
780
785
790
795
800
805
810
815
820
825
830
835
840
845
850
855
860
865
870
875
880
885
890
895
900
905
910
915
920
925
930
935
940
945
950
955
960
965
970
975
980
985
990
995
1000
1005
1010
1015
1020
1025
1030
1035
1040
1045
1050
1055
1060
1065
1070
1075
1080
1085
1090
1095
1100
1105
1110
1115
1120
1125
1130
1135
1140
1145
1150
1155
1160
1165
1170
1175
1180
1185
1190
1195
1200
1205
1210
1215
1219

//

Met Gly Val Asp Lys Thr Gln Glu Glu Ile Val Leu Glu Asn Lys 15
5 Pro Glu Leu Leu Asn Glu Tyr Lys Phe Ile Tyr Lys Asp Thr Glu 30
Tyr Asp Cys Thr Glu Tyr Ala Lys Ser Asn Lys His Pro Gly Gly 45
Leu Asn Phe Leu Asn Leu Phe Ile Asp Glu Lys Gln Asp Leu Thr 60
Glu Tyr Phe Arg Thr Leu His Ser Lys Gln Ala Leu Lys Ile Leu 75
Lys Ser Phe Pro Lys Thr Gly Ala Lys Gln Glu Glu Thr Glu Ser 90
10 Ser Lys Arg Phe Ser Ile Leu Lys Lys Lys Leu Lys His Leu Phe 105
Glu Pro Asn Trp Pro Ile Glu Ile Gly Leu Phe Leu Thr Thr Phe 120
Thr Leu Phe Val Thr Gly Cys Leu Thr Gln Lys Trp Tyr Phe Ser 135
Ile Pro Leu Leu Val Leu Met Gln Ile Ile Ser Gly Trp Ile Gly 150
His Ser Met Asn His Asn Arg Asn Pro Ile Leu Arg Lys Phe Ala 165
15 Leu Val Tyr Ala Pro Leu Cys Gly Gly Phe Ser Asn Lys Trp Trp 180
Gly Arg Lys His Asn Gln His His Met Phe Thr Asn Asn Ile Leu 195
Lys Asp Glu Asp Ile Gln His Asp Tyr Lys Leu Trp Gln Phe Pro 210
Phe Leu Phe Leu Lys Trp Lys Leu Asp Ser Ile Leu Ala Ser Tyr 225
Tyr Glu Phe Glu Gly Ile Phe Leu Ala Leu His Trp Val Leu Leu 240
20 Phe Asn Gln Asn Phe Tyr Ile Val Ile Leu Ser Glu Leu Ile Ala 255
Gly Phe Phe Ser Ala Ser Ile Leu Val Gly Asn His Glu Asn Glu 270
Met Lys Phe Glu Arg Arg Ile Thr Leu Pro Phe Phe Glu His Gln 285
Ile Ala Ala Ser Arg Asn Tyr Ala Phe His Asp Ile Phe Ser Leu 300
Leu Ile Met Gly Gly Met Gln Tyr Gln Thr Glu His His Phe Phe 315
25 Pro Gln Ile Pro Phe Tyr Arg Leu Leu Pro Lys Ala Arg Val Ile Ile 330
Ala Glu Glu Leu Lys Lys Trp Asn Leu Lys Ile His Glu Gly Pro 345
Ile Phe Glu Lys Ser His Leu 352

SEQ ID Nr. 3:

ID	SEQ ID Nr. 3; DNA; 2492 BP.	
SQ	Sequence 2492 BP; 952 A; 331 C; 309 G; 900 T; 0 other;	
5	TAAACGATT ATAAATATCA CACAAATTAAC ACCGAAAGAG AGTTAAAGTG CTAATATTAA	60
	TAATATAAATT TATCTAAATT GAAAGATGGT TCAATTAAAT TGAAATTAAT TTGAAGCAAA	120
	ATAATTCGAT TCGTGTARAG TGGAAATTGA AAGAAATTAAG GTTTAGAAA GTTCTTTTGG	180
	TAAATAATA GAGTTAAAGT CAAATAAATTT TATATTAGGT AAATCTTAAA GTGTGCAAAAT	240
	GTATATCAATTA ACAATTCCTAA ATGATGCAAA ATATTTAAAT TATTAAAAAT AATGATAGTT	300
	AATAAAATCA ATATTTTCATA ATAATAATAA GGTATCTATC TATCTATCAA TATTTCAATA	360
10	AATATTAATT AARAGGTTAT ABAATAAGTA AGCAAACTAA ATTTAAAAA CAAGCATTAT	420
	GGGAGTTGAT AGACTTTAAG AAGAAATTTGT TCTTGAATAA AAACCCGAAC TTCTCAACGA	480
	ATACAAATTT ATTTACAAGG ATACTGAATA TGACTGCACT GAATATGCTA AATCAATAAA	540
	GCATCCTGGC GGTCTTAATT TCCTCAATTT GTTTATTCAT GAGAAGTAAG ATTTGACTGA	600
	ATATTTTCAG ACACTCCATT CTAAGTAGGC TTGAAATAAT TTAAAAATCCT TCCCTAAGAC	660
15	TGGCGCAAAA TAAGAGGAGA CTGAATCTTC AAGAGAGATC TCANTATTAA AGAAAAAGCT	720
	TAAGCATGTA AATACATTCA AATGATATCT TTATTGAGCA TATTTAGCAT AATTTGATAA	780
	TTTTCATAAG CATATTTTAA ATTATAAAAA TGAACATATT TTTAAATTAA TTTAGTTATT	840
	CGAACCAAC TGGCCTATCG AAATGGGTTT ATTCTTAATC ACCTTTACTT TATTTGTCAC	900
20	TGGATGTTTG ACTCAAAAGT GGTAATTTCTC TATCCOCTTT CTGTCTTTAA TGCAAATCAT	960
	CAGTGGTGG ATTTGGTCACT CTATGAACCA CAATCGTAAC CCTATATTAA GAAAAATCGC	1020
	TTTAGTCTAC GCTCCTCTTT GTGGTGGTTT CTCTAATAAA TGGTGGGTA GGAAGCACAA	1080
	TCAGTAACC ATAATATTTA ATATAAATAT ATAAAGATTT TTTGGTTTTG CGAGGAAAAA	1140
	AGTCATATTT TGATGCTTTA ATAGTACAAA CAATATTTGA TTGTTATGAT TAAATTATTA	1200
25	AAGATCTTAA TTTAGCCTTT TTTAAAAAAT TCAAAATAAT TTGAAGATAA TATTTATTAA	1260
	GTATAATAAA TGAATTAAGC AAAATCTGTA CCAAAAATCT GTAAATACAA AATCAACTTC	1320
	ACACAAAGAT TACACATAGC ATTTTATTTT TTATAATAAA ATAAATGAA ATAGTTTTTT	1380
	ATTTTAAAGAA ATGAAATAAC TTTTTCCTCC TATGATTTTC AATTAATAAA AAGCATTGCT	1440
	ATACAAATAA TTGAAAAAAG CTAAATCTTT TTTCTATTAA AATTAATTAAC AAATTGTAAG	1500
30	AGATTAAATT TACCATTTAA TTTAAGTACC GCAATAAGCA AATCTCTATT TTTTTTAAGC	1560
	AATGAGGTCA CGGATAAATA TTATCATACT ATTCCTCAAT AATAAATCAT CTTTAAATA	1620
	ATTTTAAACT AATTAATATA ATTCTAATAA AAGCATCATA TGTTCAACAA CAACATTTCTA	1680
	AAGGACGAAG ATATCTAACA CGATTACAAA TTGTGGTAAT TCCOCTTCTT ATTTTAAAG	1740
35	TGGAATTTAG ACTCCATCTT AGCTTCTTAT TATGAATTTG AAGGAATCTT CCTTGCCTTG	1800
	CAGTGGGTAT TATTATTCAA CTAAAACTTC TATATCGTAA TTCTTTCTGA ATTGATTGCT	1860
	GGTTTCTTCA GTGCTTCTAT TCITGTTTGA AATCATGAAA ATGAAATGAA ATTCGAAAGA	1920
	AGAATCACTT TACCATTTT CAAACATCAA ATAGCTGCAA GCAAGAACTA CGCTTCCAC	1980
	GACATATTCT CTCTACTTAT TATGGGTGGT ATGTAATATT AGACTGAACA TCACTTTTTC	2040
	CCATAAATTC CTTTCTACAG ATTACCCCAA GCTCGTGTCA TAATTGCTGA AGAATTTAAG	2100
40	AAGTGAACC TTAAGATTCA TGAAGACCT ATTTTGGAAA AATCTCACCT TTGAAAAATA	2160
	ATAAATTTAT TTTAATGCA TATTTTATTA GTAATACTAA CAATTGTAGG AAATGTGTTA	2220
	TGGTTTGTTT ACTTATTACT TTTTAATCTG AGAAACAGT CTTAAACATTT ATTCGATTTT	2280
	ATTTAACATT ACTTTTAAA AAACAATTTT GCTTACTATA AATTACATA AGTATAGTAA	2340
	GAACTAAGT TGATGGTGTT ATTTTTTAAT TTTTCTAAT AATTGTGAA TAAACGATGA	2400
45	TTTAATTTAT TAATCCAGCA AATAGCATTA ATTATATTAC AATACCAGC CCGGGCCGTC	2460
	GACCACGCGT GCCCTATAGT GAGTCGTATT AC	2492